ENZIME

In organismele vii, mii de reactii chimice se desfasoara foarte rapid in conditiile de presiune si temperatura ale acestuia. Toate aceste transformari sunt mediate de **enzime** (denumite initial **fermenti** sau **diastaze)**, proteine specializate sa catalizeze reactiile metabolice.

Substantele transformate in aceste reactii se caracterizeaza printr-o tendinta limitata de reactie "in vitro" in aceleasi conditii cu cele din organism.

De exemplu, oxidarea glucozei in celule se realizeaza rapid, glucoza fiind un compus ce inmagazineaza o mare cantitate de energie prezentand un anumit potential termodinamic, desi in laborator, in aceleasi conditii ca cele din organism, aceasta este stabila in prezenta oxigenului.

Astfel de procese, favorabile termodinamic, pot decurge cu viteze crescute datorita actiunii catalitice a enzimelor.

**Caracteristicile enzimelor**

Enzimele pot fi definite **biocatalizatori** care prezinta urmatoarele trasaturi caracteristice:

1. Enzimele au o **putere catalitica** enorma accelerand viteza reactiilor cu pana la 1016 fata de viteza reactiei necatalizate. Aceasta capacitate depaseste puterea oricarui catalizator folosit in sinteza organica. Enzimele au aceasta imensa putere catalitica in solutii diluate, in conditii moderate de pH si temperatura.

Puterea catalitica poate fi definita ca raportul intre viteza reactiei catalizate si viteza reactiei necatalizate enzimatic.

2. Enzimele nu se consuma si nu se transforma in reactiile catalizate.

3. Enzimele se caracterizeaza printr-o mare **specificitate**. Orice enzima este foarte selectiva atat in ceea ce priveste substanta pe care o transforma (**substrat**) cat si din punctul de vedere al reactiei catalizate.

**E** (enzima)

http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image001.gifTransformarea **S P** (produsi) se desfasoara fara reactii secundare, astfel ca rezulta numai compusii doriti. Prin aceasta actiune enzimele se deosebesc de catalizatorii din chimia organica, reactiile desfasurate in absenta enzimelor avand randamente mai scazute si fiind insotite de reactii secundare.

4. Enzimele scad energia de activare a moleculelor de substrat pe care le transforma accelerand astfel viteza reactiei biochimice.

5. **Capacitate de reglare**. Reglarea activitatii enzimatice se realizeaza in moduri diferite ce variaza de la controlul cantitatii de enzima sintetizate de celula pana la modularea activitatii sale prin interactiuni reversibile cu activatori si inhibitori metabolici. Activitatea variata a enzimelor poate fi pusa pe seama capacitatii de adaptare structurala si functionala a proteinelor. Enzimele contribuie astfel la coordonarea si reglarea proceselor metabolice.

7. Enzimele se gasesc in celule si actioneaza in cantitate foarte mica dar cu efect semnificativ.

8. Enzimele pot cataliza reactiile in conditiile organismului, la temperatura de aproximativ 37oC, in conditii de in general neutru si la presiune atmosferica.

**Nomenclatura si clasificarea enzimelor**

La inceputurile enzimologiei au fost caracterizate in special enzime ce catalizau reactii de hidroliza a legaturilor covalente din molecula diverselor substraturi si, de aceea, erau denumite prin adaugarea sufixului **aza** la numele substratului asupra caruia actionau.

De exemplu: ureaza (enzima care hidrolizeaza ureea), lipaza (hidrolizeaza lipidele), fosfataza (hidrolizeaza legaturile fosfat din compusii organici fosforilati), amilaza (care hidrolizeaza amidonul), proteaze (enzime care scindeaza proteinele), etc. Altele erau denumite cu numele uzuale mai vechi: pepsina, tripsina, etc.

Aceasta nomenclatura a condus insa la o serie de confuzii si, din acest motiv, Comisia pentru Enzime a Uniunii Internationale de Biochimie a introdus in 1956 o baza sistematica pentru denumirea enzimelor.

In prezent fiecarei enzime ii este atribuit un **numar de cod** si un **nume sistematic**.

**Numarul de cod** este format din 4 cifre precedate de prescurtarea EC (Enzyme Comission), acestea indicand:

        prima cifra - **clasa** de enzime (in functie de reactia catalizata);

        a doua cifra - **subclasa** (da indicatii asupra donorului din reactie);

        a treia cifra - **subsubclasa** (face referire la natura acceptorului din reactie);

        a patra cifra indica **enzima** individuala.

In functie de reactia pe care o catalizeaza, miile de enzime sunt repartizate in 6 clase:

**1. Oxidoreductaze; 2. Transferaze; 3. Hidrolaze;4. Liaze; 5. Izomeraze; 6. Ligaze**

**Numele sistematic** contine informatii referitoare la :

a.       natura donorului;

b.      natura acceptorului;

c.       tipul reactiei catalizate.

**1. Oxidoreductazele** catalizeaza reactii de oxidoreducere, prin care se transfera hidrogen sau electroni intre doua substraturi. Cifra subclasei indica donorii echivalentilor de reducere:

1.1-alcool;

1.2-aldehide sau cetone;

1.3-catene hidrocarbonate;

1.4-amina primara;

1.5-amina secundara;

1.6-formele reduse ale coenzimelor p 313c26d iridinice,

1.7-alti compusi azotati.

Cifra a treia se refera la acceptorul de hidrogen sau electroni: 1.1.1.-formele oxidate ale coenzimelor piridinice, 1.1.2-citocromii, 1.1.3-O2, 1.1.99-alti acceptori.

Subclasele oxidoreductazelor au si denumiri uzuale: *oxidaze, peroxidaze, dehidrogenaze, monoxigenaze*.

**Coenzimele oxidoreductazelor** sunt diferite: *coenzime piridinice* (NAD+, NADP+), *coenzime flavinice* (FAD, FMN), *coenzime hematinice* (citocromii) etc.

*Exemplu:* EC 1.1.1.27 L-lactat: NAD+oxidoreductaza (uzual lactat dehidrogenaza).

L-lactat + NAD+ = piruvat + NADH + H+

In cazul in care in reactia catalizata de oxidoreductaze se realizeaza si o alta transformare se mentioneaza in paranteza actiunea secundara a enzimei.

*Exemplu:* EC 1.1.1.41 L-izocitrat:NAD+oxidoreductaza (decarboxilanta) catalizeaza oxidarea acidului izocitric odata cu decarboxilarea acestuia.

**2. Transferazele** sunt enzime care catalizeaza transferul unor grupe variate intre doua substraturi. Numele acestora este in functie de natura grupei transferate: metiltransferaze, aminotransferaze, formiltransferaze, fosfotransferaze.

A doua cifra indica tipul de grupa transferata:

2.1-grupa cu un atom de carbon;

2.2-grupe aldehidice sau cetonice;

2.3-grupe acil, 2.4-grupe glicozil;

2.5-grupe alchil,;

2.6-grupe ce contin azot;

2.7-grupe ce contin fosfor;

2.8-grupe ce contin sulf.

A treia cifra descrie exact grupa care este transferata in cazul in care subclasa presupune mai multe grupe: 2.1.1-metil transferaze, 2.1.2-hidroximetil transferaze, 2.6.1-amino transferaze.

**Coenzimele transferazelor** sunt numeroase: *piridoxal fosfatul*, *tiamin pirofosfatul*, *coenzima A*, *acizii folici*, *coenzimele B12*, *biotina*, *S-adenozil metionina*, *nucleotid polifosfati* (ATP), *formele active ale unor compusi* (UDP-glucoza, CDP-colina) etc.

*Exemplu:* EC 2.7.1.2 ATP:D-glucozo-6-fosfotransferaza (glucokinaza)

D-glucoza + ATP = D-glucozo-6-fosfat + ADP

In cazul transferazelor de grupe fosfat denumirea face obligatoriu referire la acceptor. 2.7.1-alcool, 2.7.2.-carboxil, 2.7.3-grupa cu azot.

Pentru fosfotransferazele ce necesita ATP ca donor de grupe fosfat se mai utilizeaza denumirea uzuala **kinaza**.

**3. Hidrolazele** sunt enzime care participa la hidroliza unor legaturi diverse, fiind subclasificate (a doua cifra) in functie de natura acestora:

3.1-legatura esterica (esteraze);

3.2-legatura glicozidica (glicozidaze);

3.3-legatura fosfat (fosfataze);

3.4-legatura peptidica (peptidaze);

3.5-legaturi intre carbon si azot.

A treia cifra indica mai exact tipul de legatura hidrolizata: 3.1.1-hidroliza esterilor carboxilici, 3.1.6-hidroliza esterilor acidului sulfuric.

*Exemplu:* EC 3.1.3.9 D-glucozo-6-fosfat-fosfohidrolaza (glucozo-6-fosfataza)

D-glucozo-6-fosfat + H2O = D-glucoza + Pi

**4. Liazele** sunt enzime care participa la formarea unor legaturi duble C-C, C-N, C-O, prin indepartarea nehidrolitica a unor grupe din substrat. A doua cifra indica tipul legaturii scindate:

4.1-C-C, 4.2-C-O, 4.3-C-N, 4.4-C-S. A treia cifra face referire la natura grupei indepartate: 1-carboxil, 2-aldehida, 3-α-cetocarboxil.

Se poate face referire la acestea si folosind denumirile uzuale: *aldolaze, hidrataze, sintaze, decarboxilaze.*

*Exemplu*: EC 4.1.1.22 L-histidin-carboxi-liaza (histidin decarboxilaza)

Histidina = Histamina + CO2

**5. Izomerazele** sunt enzime care permit desfasurarea reactiilor de izomerizare fiind subclasificate in functie de tipul reactiei catalizate:

5.1-racemaze si epimeraze;

5.2-izomeraze cis-trans;

5.3-oxidoreductaze intramoleculare;

5.4-mutaze.

A treia cifra indica tipul de molecula ce este supus izomerizarii: 5.1.1-racemaze ce transforma aminoacizi, 5.1.3-epimeraze ce transforma carbohidrati, etc.

*Exemplu*: EC 5.1.1.1 Alaninracemaza transforma L-alanina in D-alanina.

**6. Ligazele** sunt enzime care intervin in formarea unor noi legaturi C-C, C-O, C-N, C-S folosind ATP-ul ca sursa de energie. A doua cifra indica legatura formata:6.1-C-O, 6.2-C-S, 6.3-C-N, 6.4-C-C. A treia cifra descrie mai exact legatura ce se formeaza: 6.3.1-amidosintetaze, 6.3.2-peptidsintetaze, 6.4.1- carboxilaze.

*Exemplu*: EC 6.3.1.2 L-glutamat:amoniac ligaza (glutamin sintetaza)

L-glutamat + ATP + NH3 = L-glutamina + ADP + Pi

EC 6.4.1.1 piruvat carboxilaza

L-piruvat + CO2 = L-oxalilacetat

Localizarea intracelulara a enzimelor

In celula, enzimele sunt localizate specific in anumite compartimente fie in organite celulare, fie in citoplasma.

Separarea organitelor celulare prin ultracentrifugare urmata de identificarea specifica a enzimelor prin tehnici imunohistochimice a reprezentat modalitatea prin care s-a stabilit exact localizarea intracelulara a enzimelor.

Unele procese au loc in toate tipurile de celule, enzimele respective fiind raspandite ubicuitar, cum ar fi de exemplu, enzimele implicate in biosinteza proteinelor si acizilor nucleici, enzimele glicolitice.

Alte procese au loc numai in anumite celule, ca urmare numai acestea poseda echipamentele enzimatice specifice. De exemplu, enzimele implicate in sinteza hormonilor tiroidieni sunt numai in tiroida, enzimele implicate in biosinteza ureei se gasesc numai in celulele hepatice.

Fiecare organ se caracterizeaza printr-un **profil enzimatic** reprezentat de enzimele care actioneaza in diferitele compartimente din celula.

**Membrana celulara** contine enzime implicate in *transportul substantelor*.

**Mitocondriile** prezinta enzime ce catalizeaza procese generatoare de energie: membranele externa si interna contin enzimele implicate in *lantul respirator*, *sinteza fosfolipidelor*, *elongarea* si *desaturarea acizilor grasi*, iar matricea mitocondriala contine enzimele *ciclului Krebs*, enzimele implicate in *decarboxilarea oxidativa a cetoacizilor catabolismul* *acizilor grasi*, *dezaminarea aminoacizilor*, *biosinteza ureei.*

**Nucleul** contine enzimele implicate in *metabolismul acizilor nucleici*.

**Ribozomii** abunda in enzime implicate in diferitele faze ale *biosintezei proteinelor*. Ribozomii liberi sintetizeaza proteinele celulare, iar cei fixati de reticulul endoplasmatic, proteinele de export.

**Citoplasma** contine enzimele *glicolitice*, *caii pentozofosfatilor*, enzimele din *biosinteza acizilor grasi*, a *nucleotidelor* etc.

**Lizozomii** abundenti in ficat, rinichi, globule albe contin *hidrolaze*: enzime *proteolitice*, *ribonucleaze*, enzime care *hidrolizeaza proteoglicanii*, *sfingolipidele*.

**Complexul Golgi** contine enzime implicate in *exportarea proteinelor sintetizate* in reticulul endoplasmatic si *maturarea glicoproteinelor si proteoglicanilor*.

Unele enzime au localizare mixta, citoplasmatica si mitocondriala, cum sunt transaminaza glutamic oxalilacetica, malat dehidrogenaza, izocitrat dehidrogenaza.

**Structura enzimelor**

Enzimele sunt proteine globulare putand avea o structura:

a.       unitara - **enzime monocomponente**, alcatuite numai din aminoacizi: tripsina, chimotripsina, pepsina, lipaza, ribonucleaza;

b.      binara- enzime alcatuite dintr-o **parte proteica** (**apoenzima**) si o **grupa neproteica**, definite de Euler astfel:

Holoenzima = Apoenzima + Cofactor

Studiul structurii enzimelor s-a realizat prin tehnici exacte: difractie de raze X, dicroism circular, fluorescenta, analize in UV si IR, RMN, spectrometrie Raman etc.

**Caracteristicile componentei proteice**

**Apoenzima** fiind proteina are toate nivelurile structurale. Structura primara este stabila, determinata de secventa aminoacizilor din lantul polipeptidic. Structura secundara reprezinta procentul de configuratie spatiala α-helix (in special) stabilizat prin legaturi de hidrogen. Structura tertiara se refera la asamblarea formelor elementare in spatiul tridimensional si plierea catenelor polipeptidice. Majoritatea aminoacizilor polari se dispun la exteriorul moleculei, iar aminoacizii nepolari la interior, formand o zona hidrofoba interna. Structura cuaternara apare la majoritatea enzimelor care sunt alcatuite din mai multe catene polipeptidice identice (**enzime homomultimerice**) sau diferite (**enzime heteromultimerice**), asocierea protomerilor facandu-se prin legaturi de hidrogen, interactiuni electrostatice, forte Van der Waals.

Ca orice proteina, enzimele se pot denatura ca urmare a unor modificari la nivelul structurilor secundara si tertiara.

Componenta proteica a enzimelor se caracterizeaza prin urmatoarele:

         este nedializabila si termolabila;

         confera specificitatea de substrat pentru activitatea unei enzime;

         contine situsul catalitic si pe cel la care se leaga efectorii in cazul enzimelor allosterice;

         determina legarea substratului la situsul catalitic si a efectorilor la alt situs.

**Caracteristicile cofactorilor**

Cofactorii sunt compusi cu structura chimica variata derivati de la vitamine sau ioni metalici, legati mai labil de partea proteica (**coenzime**) sau fiind intim asociati cu aceasta prin legaturi covalente (**grupe prostetice**) (Tabel 4.1).

Acestia se caracterizeaza prin urmatoarele:

         sunt termostabili;

         sunt dializabili;

         sunt indispensabili pentru desfasurarea activitatii enzimei;

         confera specificitatea de reactie pentru o enzima;

         intervin in reactie inducand conformatia optima a enzimei, favorizand aranjamentul adecvat reactiei sau transferand electroni sau grupe chimice.

**Sisteme multienzimatice**

Exista cai metabolice in care toate enzimele ce catalizeaza reactii individuale sunt asociate sub forma unor **sisteme multienzimatice** (**enzime polifunctionale**). Acestea sunt sisteme proteice complexe capabile sa foloseasca mai multe coenzime diferite. Sunt fixate prin legaturi slabe, in ordinea corespunzatoare intrarii in actiune, pe o proteina centrala, ce poate fi chiar una dintre enzime.

**Tabel 4.1 Exemple de cofactori enzimatici**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Ioni metalici** | **Enzima** | **Coenzima** | **Grupa transferata** | **Enzima** |
| Cu2+  Zn2+  Mg2+  Mn2+  K+  Fe2+, Fe3+ | Citocrom oxidaza  Alcool dehidrogenaza  Hexokinaza  Arginaza  Piruvat kinaza  Catalaza  Peroxidaza | NAD+  FAD  PALPO  Biotina  FH4 | H+  H+  NH2  CO2  -CHO  -CH3 | Lactat dehidrogenaza  Succinat dehidrogenaza  Aspartat aminotransferaza  PropionilCoA carboxilaza  Timidilat sintaza |

Exemplul cel mai elocvent este reprezentat de complexele implicate in decarboxilarea oxidativa a α-cetoacizilor: piruvat dehidrogenaza, α-cetoglutarat dehidrogenaza formate dintr-un

ansamblu proteic, patru coenzime (TPP, NAD+, acid lipoic, coenzima A) , ionul Mg2+, cu participarea finala a NAD+. Un alt exemplu este acid gras sintaza care intervine in biosinteza acizilor grasi formata din 7 enzime legate de o proteina.

**Izoenzime**

O parte din enzimele care au structura cuaternara se prezinta sub mai multe forme moleculare, denumite **izoenzime**. Toate catalizeaza aceeasi reactie, dar cu viteze diferite.

Structural difera prin raportul in care sunt asociate lanturile de baza. Acestea sunt codificate de gene diferite si se sintetizeaza in cantitate diferita in diferite tesuturi.

De exemplu, **lactat dehidrogenaza** este un **tetramer** ce prezinta cinci izoenzime care pot fi separate prin electroforeza. Exista doua tipuri de lanturi polipeptidice M (muscle=muschi) si H (heart=inima). Are doua **forme parentale** cu toate cele patru catene identice LDH1 (H4) si LDH5 (M4) si trei **forme hibride** rezultate prin combinarea catenelor: LDH2 (H3M), LDH3 (H2M2), LDH4 (HM3). Tipul de asociere a monomerilor este in functie de localizarea celulara a enzimei si de calea metabolica particulara in care este integrata in tesuturi.

LDH1 predomina in miocard, LDH5 in ficat si musculatura scheletica, in timp ce formele hibride sunt distribuite diferit la aceste niveluri si in alte tesuturi (plamani, rinichi, elemente figurate, splina, creier, etc).

Un alt exemplu bine caracterizat este cel al **creatin kinazei**, un **dimer** cu trei izoenzime: CK-MM, CK-MB, CK-BB (M-muscle= muschi, B-brain=creier) distribuite diferit in organele ce le contin (MB predominant in miocard, MM in muschii scheletici si putin in miocard, BB in creier si putin in prostata, rinichi, stomac, etc).

**Centrul activ al enzimelor**

Procesul enzimatic nu se desfasoara oriunde in molecula enzimei, ci numai in anumite zone care au o dispozitie spatiala corespunzatoare, alcatuite din 2-4 aminoacizi. Aceste zone se numesc "**centri activi**" si reprezinta aranjamentul spatial adecvat "prinderii" substratului.

Legarea substratului la centrul activ al enzimei ii imprima o stare de tensiune moleculara care faciliteaza reactia biochimica. In centrul activ se gasesc numai anumiti aminoacizi care prezinta grupe -OH, - SH, - COOH, -NH2, radical imidazol (de exemplu, serina, histidina, acid aspartic, lisina).

In cazul enzimelor cu structura binara, in centrul activ se poate distinge un **situs de fixare** care se combina cu substratul prin legaturi labile (la formarea caruia participa **aminoacizi** **auxiliari**) si un **situs catalitic** (format din **aminoacizii colaboratori** care actioneaza asupra substratului), importanta pentru aceasta interactiune fiind prezenta cofactorilor. Aminoacizii care nu sunt implicati in reactia enzimatica sunt **aminoacizi necolaboratori.** Functionalitatea centrului catalitic este consecinta structurii spatiale a proteinenzimei care prin dispozitia sa in spatiu aduce anumiti aminoacizi distantati in structura primara intr-o pozitie optima pentru legarea substratului (Fig.4.1).

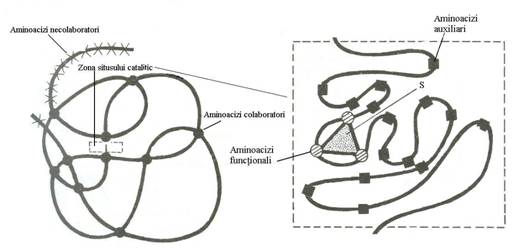


Fig.4.1. Organizarea centrului activ (dupa Louisot P, 1982)

De exemplu, pentru actiunea chimotripsinei, enzima care hidrolizeaza legaturile peptidice, este esentiala legarea substratului la Ser195 care constituie cu Asp102 si His57 centrul activ al enzimei, interactiunea acestora fiind posibila datorita modificarii conformatiei spatiale a proteinei in timpul reactiei enzimatice.

Enzimele allosterice prezinta doua situsuri: **situsul catalitic** la care se leaga substratul si **situsul allosteric** la care se leaga efectorul allosteric, activator sau inhibitor (Fig.4.2).

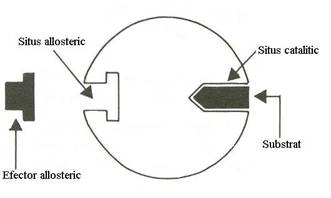


Fig.4.2 Organizarea centrului activ la enzimele alosterice

**Specificitatea enzimelor**

Specificitatea de actiune a enzimelor este o caracteristica esentiala a acestora conferita de componente. Aceasta este unul dintre cele mai remarcabile atribute biologice care stau la baza coordonarii proceselor biochimice.

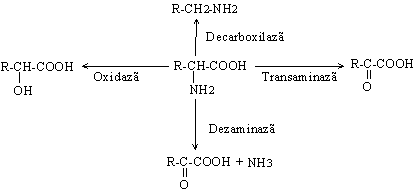
Diversele forme de manifestare a specificitatii enzimelor pot fi incadrate in doua categorii:

**1. specificitatea de reactie;**

**2. specificitatea de substrat.**

**Specificitatea de reactie**

Enzimele catalizeaza un anumit tip de reactie, in functie de modul de actiune asupra substratului. Acest tip de specificitate sta la baza clasificarii enzimelor si este datorat cofactorului care guverneaza tipul de reactie in care se va angaja substratul. De exemplu, un anumit α-aminoacid poate fi substrat pentru mai multe enzime care au cofactori diferiti.



**Specificitatea de substrat**

Enzimele difera in ceea ce priveste specificitatea de substrat in functie de mecanismul de reactie si de natura substratului. Enzimele actioneaza asupra anumitor: substraturi, grupe functionale, legaturi chimice.

Exista trei tipuri de specificitate determinata de substrat:

**a.      specificitatea stereochimica;**

**b.      specificitatea relativa;**

**c.       specificitatea absoluta.**

*Specificitatea stereochimica.* Existenta unor compusi biologici sub forma de izomeri determina posibilitatea actiunii selective a unor enzime asupra unuia dintre ei. Enzima leaga substratul pe baza complementaritatii intre centrul activ si un fragment din molecula, respectata numai in cazul unuia dintre izomeri (Fig.4.3). Celalalt izomer avand o dispozitie spatiala diferita nu se poate lega de enzima. Enzimele pot sa determine:

a.       transformarea unui anumit izomer geometric (cis sau trans);

b.      formarea unui anumit izomer geometric sau optic;

c.       transformarea unui substrat apartinand unei anumite serii sterice D sau L.

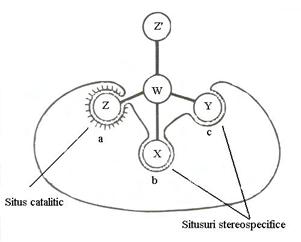


Fig.4.3 Reprezentare schematica a stereospecificitatii:

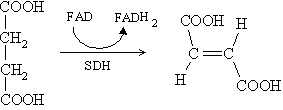
a - situs catalitic; b,c - situsuri de fixare specifice

Exemple: Lactat dehidrogenaza (LDH) este o enzima care determina transformarea acidului L-lactic dar nu si pe cea a acidului D-lactic.

De asemenea, determina transformarea unui compus optic inactiv, acidul piruvic, intr-un compus optic activ, acidul L-lactic, realizand o **sinteza asimetrica**.

        L-aminoacid oxidaza care catalizeaza reactiile de dezaminare a L-aminoacizilor si D-aminoacid oxidaza care transforma D-aminoacizii;

        Succinat dehidrogenaza (SDH) catalizeaza preferential dehidrogenarea acidului succinic cu formarea acidului fumaric (izomerul trans).

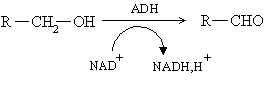


        Maltaza hidrolizeaza legaturile glicozidice ale α-glucozei nu si pe cele ale β-glucozei, avand astfel **specificitate anomerica.**

**Specificitatea relativa de grup. Enzimele din aceasta categorie manifesta un spectru mai larg de activitate, actionand asupra unui grup de substraturi ce prezinta structura asemanatoare.**

Exemple:

        Alcool dehidrogenaza (ADH) transforma toti alcoolii cu numar mic de atomi de carbon:



        Glicozidazele actioneaza numai asupra legaturii glicozidice**;**

        Hexokinaza catalizeaza fosforilarea mai multor hexoze (glucoza, fructoza, manoza, galactoza) in prezenta ATP:

http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image015.gif

        Fosfatazele catalizeaza numai hidroliza esterilor fosforici;

        Peptidazele actioneaza numai asupra legaturilor din peptide si proteine;

        Lipazele hidrolizeaza legatura esterica dintre glicerol si acizii grasi;

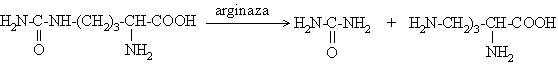
        Tirozinaza oxideaza fenolii la compusi chinonici .

        Un caz aparte il reprezinta fosfolipazele care actioneaza asupra aceluiasi substrat (fosfolipidele) dar cu un punct de scindare diferit, fiind un amestec de specificitate de substrat si de actiune.

**Specificitatea absoluta. Enzimele din aceasta categorie actioneaza strict asupra unui anumit tip de substrat nerecunoscand nici o modificare a substratului respectiv. Ele nu sunt specifice pentru o anumita legatura sau grupare din structura substratului si recunosc doar substratul in totalitate.**

Exemple:

        Arginaza actioneaza numai asupra argininei:



        Ureaza catalizeaza numai hidroliza ureei:

http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image019.gif

        Anhidraza carbonica catalizeaza sinteza acidului carbonic:

http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image021.gif

**Cinetica enzimatica**

Prin studiul cineticii enzimatice este explicat modul in care enzimele actioneaza, permitand determinarea **vitezei maxime** de reactie a unei enzime si a **afinitatii** sale pentru substrat sau pentru unii efectori. Determinarea vitezei de reactie nu releva stoechiometria reactiei sau mecanismul acesteia, deci este necesara o ecuatie care sa faca legatura intre viteza initiala a reactiei (determinata experimental) si concentratia reactantilor.

Desi cazul enzimelor monomerice cu un singur substrat este relativ rar, **cinetica clasica** a enzimelor monomerice in faza stationara cu un singur substrat (prezentata in continuare) este modul cel mai simplu de a trata si a intelege cinetica enzimatica. Cele mai multe enzime au insa mai multe substaturi dand nastere la produsi diferiti nerespectand comportamentul clasic.

In reactia S --------> P, pe masura ce reactia avanseaza, creste concentratia produsului de reactie si scade cea a substratului.

Ecuatia de viteza este:http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image023.gifv = - http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image025.gif = http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image027.gif= k[S]n, unde **k** este **constanta de viteza** si **n** reprezinta **ordinul de reactie**. Viteza initiala depinde de concentratia initiala a substratului la puterea n, multiplicata cu constanta de viteza.

**Ecuatia Michaelis-Menten**

In reactiile cu un singur substrat, mentinand constanta concentratia enzimei, cresterea concentratiei de substrat determina marirea vitezei de reactie pana cand se atinge o valoare maxima peste care oricat ar creste concentratia substratului viteza reactiei enzimatice ramane nemodificata (Fig.4.4). La concentratii mici de substrat, viteza de reactie este proportionala cu concentratia substratului (reactii de ordin1). La concentratii mari de substrat, viteza de reactie devine independenta de concentratia substratului (reactii de ordin 0), enzima saturandu-se cu substrat. L. Michaelis si M. Menten au propus o teorie generala de actiune a enzimelor bazata pe ideea ca enzima si substratul se asociaza reversibil pentru a forma complexul enzima-substrat.

Ecuatia vitezei reactiei enzimatice este: http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image029.gif, fiind cunoscuta ca si **ecuatia** **Michaelis-Menten**.

Ecuatia exprima faptul ca viteza unei reactii enzimatice este determinata de concentratia de substrat la acel moment si de constantele Km si vmax.

**Semnificatia Km si vmax.** Daca v = vmax/2 , inlocuind in ecuatia Michaelis-Menten se deduce faptul ca Km = [S], deci constanta Michaelis poate fi definita drept **concentratia de substrat la care viteza de reactie este jumatate din viteza maxima**. Constanta Michaelis, Km, este un indice al **afinitatii enzimei** pentru substrat, variind invers proportional cu aceasta (Tabel 4.2). Aspectul curbei descrise de ecuatia Michaelis-Menten este hiperbolic (Fig.4.4):

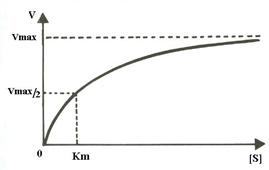


Fig.4.4 Curba de saturare cu substrat a enzimelor

Pentru orice enzima se poate defini, alaturi de Km si v max, **numarul de** **turn-over** al enzimei, ca fiind numarul de molecule de substrat convertite in produs de reactie pe molecula de enzima in unitatea de timp, atunci cand enzima este saturata cu substrat.

Ecuatia Lineweaver-Burk

Deoarece reprezentarea ecuatiei Michaelis -Menten este curba a carei interpretare este dificila, s-au realizat reprezentari liniare ale dependentei vitezei de reactie de concentratia substratului, folosite la interpretarea datelor experimentale: *reprezentarea Lineweaver-Burk, reprezentarea Hanes-Woolf,* etc.

Reciproca ecuatiei Michaelis-Menten este:

http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image033.gif (1)

Separand componentele numaratorului din partea dreapta a ecuatiei se obtine:

http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image035.gif (2) ,

care simplificata devine: http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image037.gif, denumita **ecuatia Lineweaver Burk.**

Reprezentand grafic 1/v = f(1/[S]) se obtine o dreapta, panta dreptei fiind Km/v max, intersectia cu axa 1/v in 1/vmax, iar cea cu axa 1/[S] este -1/Km (Fig.4.5).

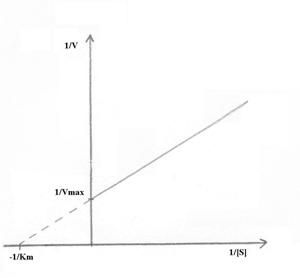


Fig.4.5 Reprezentarea ecuatiei Lineweaver-Burk

**Factorii care influenteaza activitatea enzimelor**

Fiind proteine, enzimele sunt sensibile la actiunea unor factori externi care pot sa influenteze disocierea grupelor implicate in cataliza, legarea substratului la situsul catalitic sau structura in ansamblu a partii proteice. Astfel de factori sunt: *temperatura*, *pH*-ul, *efectorii enzimatici* (*activatori* sau *inhibitori*).

**Influenta temperaturii**

Efectul temperaturii asupra activitatii enzimelor este rezultanta actiunii a doi factori opusi, **cresterea vitezei de reactie cu temperatura** si **denaturarea termica** a enzimelor. Activitatea oricarei enzime variaza cu temperatura, graficul fiind descris in Fig.4.6.

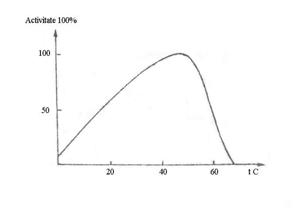


Fig.4.6 Influenta temperaturii asupra activitatii enzimelor

Fiecare enzima este caracterizata de un coeficient termic al reactiei, notat Q10, ce reprezinta cresterea vitezei de reactie pentru o crestere cu 100 a temperaturii, in conditiile mentinerii constante a celorlalti parametri. Pentru reactiile enzimatice Q10 este intre 1 si 2, fiind mai mic decat pentru reactiile necatalizate, pentru care Q10 este intre 2 si 4. Aceasta relatie este valabila numai pana la temperatura optima, pentru care viteza de reactie este maxima. Cresterea temperaturii peste temperatura optima determina scaderea vitezei de reactie, datorita denaturarii partii proteice a enzimei.

Temperatura optima pentru enzimele din organismul uman este 37-400C, la plante 50-600C, iar pentru cele din microorganismele din apele termale este 80-1000C.

Determinarea activitatii unei enzime trebuie sa se faca la o temperatura intre 25-370C.

**Influenta pH-ului**

Pentru enzimele din organismul uman, pH-ul optim de actiune este pH-ul normal al mediului in care ele isi manifesta actiunea catalitica (Fig.4.7).

Centrul activ al enzimelor contine grupe ionizabile, acide sau bazice, deci modificarea pH-ului are ca efect modificarea gradului de disociere si, implicit, modificarea vitezei de reactie.

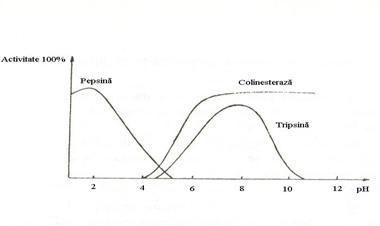


Fig.4.7 pH-ul optim de actiune a unor enzime

Pentru enzimele din organismul uman pH-ul optim este intre 5-9, dar exista enzime ce actioneaza si in afara acestui interval. De exemplu, pepsina actioneaza la pH 1,5-2, fosfatazele alcaline la pH 9-10, iar fosfatazele acide la pH 4,5-5.

**Influenta efectorilor enzimatici**

**Efectorii enzimatici** sunt substante cu structuri chimice variate care aduse in mediul de reactie pot influenta activitatea enzimei care catalizeaza reactia.

Efectorii enzimatici pot fi **activatori** sau **inhibitori***.*

**Activatorii enzimatici.**  Sunt compusi care stimuleaza activitatea enzimelor. Acestia pot fi:

        *Activatori ai unor proenzime*. Forma inactiva a enzimei se numeste **proenzima** sau **zimogen**, in care centrul activ al enzimei este mascat. Prin eliminarea unei parti din molecula, centrul activ este demascat, enzima devenind activa (Tabel 4.3).

**Tabel 4.3 Proenzime si zimogeni**

|  |  |
| --- | --- |
| **Proenzima (Zimogen)** | **Enzima** |
| Pepsinogen  Tripsinogen  Chimotripsinogen  Proelastaza  Procarboxipeptidaza  Kalicreinogen  Protrombina  Proaccelerina  Proinsulina | Pepsina (proteaza digestiva)  Tripsina (proteaza digestiva)  Chimotripsina (proteaza digestiva)  Elastaza (degradeaza elastina)  Carboxipeptidaza (peptidaza)  Kalicreina (factor de coagulare)  Trombina (factor de coagulare)  Accelerina (factor de coagulare)  Insulina (hormon hipoglicemiant) |

        *Activatori propriu-zisi.* Acestia actioneaza stimuland activitatea catalitica a enzimelor sau legarea substratului de enzima. Pot fi dati ca exemplu ionii Mg2+ pentru fosfataze, ionii Mn2+ pentru peptidaze, ionii Zn2+ ce activeaza alcool dehidrogenaza, Cl- pentru amilaza, etc.

        *Activatori ce actioneaza asupra subunitatilor reglatoare*, eliberand subunitatile catalitice. Se poate da ca exemplu AMPc, activator al proteinkinazei A. Prin legarea acestuia de subunitatile reglatoare sunt eliberate subunitatile catalitice, enzima devenind activa.

        *Activatori prin antiinhibitie*. Sunt compusi care actioneaza asupra enzimelor protejandu-le de actiunea unor inhibitori. De exemplu, vitaminele E, C, K protejeaza enzimele de actiunea nociva a peroxizilor.

        *Substante cu caracter reducator*. in acest caz activarea are loc prin protejarea grupelor -SH din centrul activ al enzimei, aceste grupe fiind necesare pentru activitatea enzimatica. Astfel de activatori sunt: glutationul, cisteina.

        *Activarea prin modificari covalente.* Sunt numeroase procesele in care actioneaza enzime ce pot exista sub doua forme activa si inactiva ce se deosebesc prin prezenta unor grupe chimice, frecvent grupe fosfat ce fosforileaza resturi de serina. Exemplu: glicogen fosforilaza b se activeaza prin fosforilare si transformare in glicogen fosforilaza a.

**Inhibitorii enzimatici** sunt compusi care influenteaza negativ activitatea enzimelor pe care o pot anula definitiv sau temporar. Ei pot afecta situsul catalitic al enzimei sau orice alta regiune a moleculei, astfel influentand legarea substratului de enzima. Actiunea inhibitorilor enzimatici este importanta pentru *controlul proceselor biochimice*, pentru *a intelege mecanismele de* *actiune a unor medicamente*, *droguri*, *otravuri*, pentru a urmari etape dintr-un proces metabolic.

**Mecanismul de actiune a enzimelor**

Intr-o reactie S 🡪 P, la un moment dat un anumit numar de molecule de substrat au energia necesara sa atinga o stare reactiva, denumita stare de tranzitie, intermediara intre S si P si instabila. Aceasta poate fie sa se transforme in produsul P fie sa reformeze substratul si se situeaza la punctul maxim al diagramei energetice ce caracterizeaza relatia intre S si P (Fig.4.9).

Reactia se desfasoara cu o viteza proportionala cu concentratia moleculelor de substrat ce au energia necesara pentru a realiza tranzitia. Cu cat este mai mare aceasta energie fata de energia medie cu atat sunt mai putine molecule capabile sa realizeze tranzitia si reactia se desfasoara mai greu.

Bariera de energie dintre energia starii de tranzitie si energia libera medie a lui S se numeste **energie de activare**.

Enzimele actioneaza prin scaderea energiei de activare si nu prin cresterea energiei reactantilor, combinandu-se cu substratul astfel incat sa permita trecerea acestuia in starea de tranzitie. Complexele formate ES si EP sunt intermediari avand energia punctelor minime in diagrama variatiei energiei dintre S si P.

Energia de activare este o bariera energetica pentru reactiile chimice, moleculele cu o energie de activare mare fiind mai stabile. Fara aceasta bariera energetica complexele macromoleculare ar reveni spontan la moleculele simple ce le compun si nu ar putea sa existe procesele metabolice si structurile ordonate.

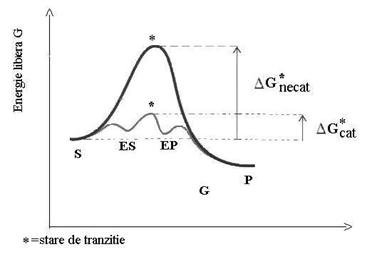


Fig.4.9 Diagrama energetica in cazul reactiilor necatalizate si catalizate

Enzimele sunt implicate in reducerea energiei de activare selectiv si specific pentru reactiile necesare pentru supravietuirea celulei.

Oricare ar fi modalitatea de interactiune dintre enzima si substrat, enzimele pot mari viteza reactiei catalizate de 109 - 1020 ori.

Relatia de structura enzima -substrat in modularea activitatii enzimei . Situsul activ al enzimei reprezinta doar o mica parte din structura acesteia, dispusa astfel incat sa creeze un "buzunar" care sa prezinte complementaritate cu substratul.

Cele doua componente se ataseaza prin legaturi slabe: interactiuni ionice, forte Van der Waals, legaturi de hidrogen intre grupe de atomi complementare.

Exista mai multe ipoteze referitoare la recunoasterea moleculara dintre substrat si enzima:

        Ipoteza "lacat -cheie";

        Ipoteza ajustarii induse;

        Ipoteza ajustarii induse si a intermediarului starii de tranzitie.

Ipoteza lacat -cheie propusa de E. Fischer postuleaza asemanarea enzimei cu un lacat, iar a substratului cu cheia corespunzatoare acestuia, legatura dintre ele facandu-se pe baza complementaritatii intre segmente prestabilite (Fig.4.10).

Dezavantajul acestei ipoteze este acela ca se considera enzima o structura rigida.

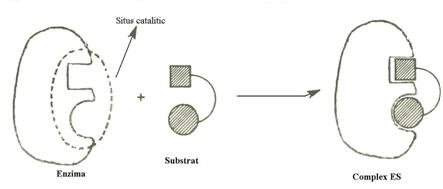


Fig.4.10 Ipoteza lacat-cheie

Ipoteza ajustarii induse propusa de D. Koshland postuleaza ca enzimele sunt molecule dinamice, foarte flexibile ceea ce influenteaza printre altele legarea substratului de enzima. Se considera ca forma situsului activ al enzimei se modifica dupa legarea substratului, recunoasterea celor doua fiind considerata o "ajustare indusa" (Fig.4.11).

Procesul este interactiv, modificandu-se simultan si concentratia substratului, ceea ce explica puterea catalitica crescuta a enzimelor.

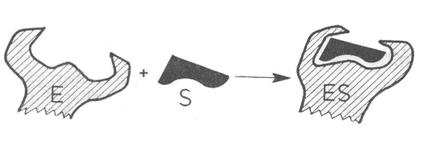


Fig.4.11 Ipoteza ajustarii induse

Ipoteza starii de tranzitie postuleaza existenta complexului ES ca o structura interactiva in care enzimele determina substratul sa adopte o "forma" ce imita structura starii de tranzitie (Fig.4.12). Conformatia activa a enzimei este relativ instabila in absenta substratului, enzima revenind la conformatia initiala.

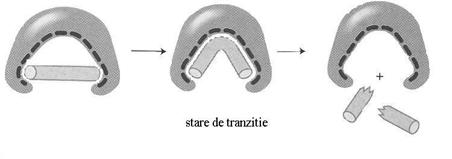


Fig.4.12 Ipoteza starii de tranzitie

Mecanismele prin care se realizeaza desfacerea unei legaturi sau refacerea altei legaturi dupa atasarea substratului sunt diferite:

        *cataliza acido-bazica*;

        c*ataliza prin ioni metalici;*

         *cataliza covalenta.*

**Cataliza acido-bazica**

Multe reactii biochimice se desfasoara cu transfer de protoni. In aceste reactii, roluri importante au acizii si bazele slab ionizate la pH fiziologic.

Acest tip de mecanism consta in capacitatea enzimelor ca, prin anumite grupe chimice (carboxil, amino, hidroxil, imidazol) sa functioneze ca acizi sau ca baze prin cedare sau acceptare de protoni.

In **chimotripsina,** aminoacizii Asp 102 si His 57 functioneaza ca grupe cu caracter acid si, respectiv caracter bazic.

**Ribonucleaza** care hidrolizeaza legaturile fosfodiesterice din ARN are ca mecanism aceasta cataliza, in care His119 actioneaza ca acid, cedand H+ si protonand puntea fosfodiesterica, iar His 12 ca baza generand ion alcoxil la grupa -OH din pozitia 3' a ribozei.

**Cataliza prin ioni metalici**

Multe enzime necesita prezenta metalelor pentru a-si manifesta actiunea, fiind din acest punct de vedere **metaloenzime** (contin ionii integrati in structuri intim legate de enzima) sau enzime ce necesita **metalele** ca **activatori** ( metalul este legat de enzima prin legaturi mai slabe).

Interactiunile ionice dintre un metal legat la enzima si substrat pot ajuta la orientarea substratului pentru reactie sau pentru a stabiliza starea de tranzitie.

Metalele functioneaza drept catalizatori electrofili sau ca si centri nucleofili la pH neutru.

**Alcool dehidrogenaza** este una dintre enzimele care folosesc acest mecanism, in care un ion Zn2+ stabilizeaza sarcina negativa ce apare tranzitiv la molecula de acetaldehida formata in reactia de oxidare a alcoolului.

**Enolaza** este enzima ce catalizeaza reactia de transformare a acidului 2,3-difosfogliceric in acid fosfoenolpiruvic in glicoliza, pentru care ionii de Mg2+ sunt implicati in interactiunea cu substratul (Fig.4.13).

In cazul acesteia, Lys 345 functioneaza ca baza extragand H+, iar Glu 211 ca acid cedand H+ grupei -OH. Prin interactiunea acidului 2,3-difosfogliceric cu Mg2+ se acidifiaza H+ de la C2 devenind mai reactiv.

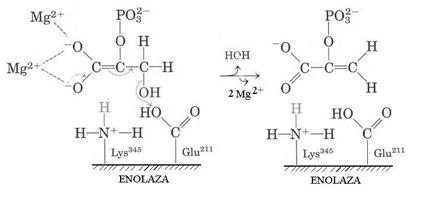


Fig.4.13 Cataliza prin ioni metalici - enolaza

**Cataliza covalenta**

In acest tip de cataliza, atacul unei grupe electrofile sau nucleofile din situsul activ al enzimei asupra substratului determina atasarea acestuia prin legaturi covalente la enzima.

Multe enzime formeaza legaturi covalente cu substratul, labilizandu-l fata de cel in forma nelegata (Tabel 4.4).

Serin proteazele (tripsina, chimotripsina, trombina) actioneaza dupa acest mecanism.

Inainte de a se lega la enzima, substratul adopta o stare de tranzitie caracterizata prin entropie scazuta, pentru care enzima are afinitate mai mare.

In cazul chimotripsinei, reactantul nucleofil este Ser 195 rezultand dupa plecarea H+ la His57 cu formarea unui alcoxid.

Serin alcoxidul format ataca legatura peptidica, aceasta se va rupe si va elibera capatul N-terminal si un intermediar acil al enzimei ce va fi apoi hidrolizat (Fig.4.14).

Tabel 4.4 Exemple de enzime ce actioneaza prin cataliza covalenta

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Enzima | Aminoacid implicat | Intermediar covalent |
| Serin proteaze  Gliceraldehid-3-P-DH  Fosfataza alcalina  Aldolaza  Decarboxilaze, transaminaze | Serina  Cisteina  Serina  Amino | Acil - Serina  Acil - Cisteina  Fosfoserina  Baza Schiff |

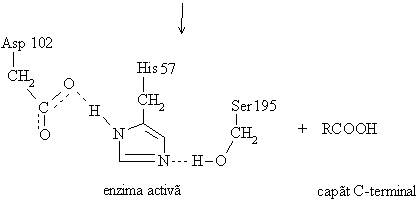
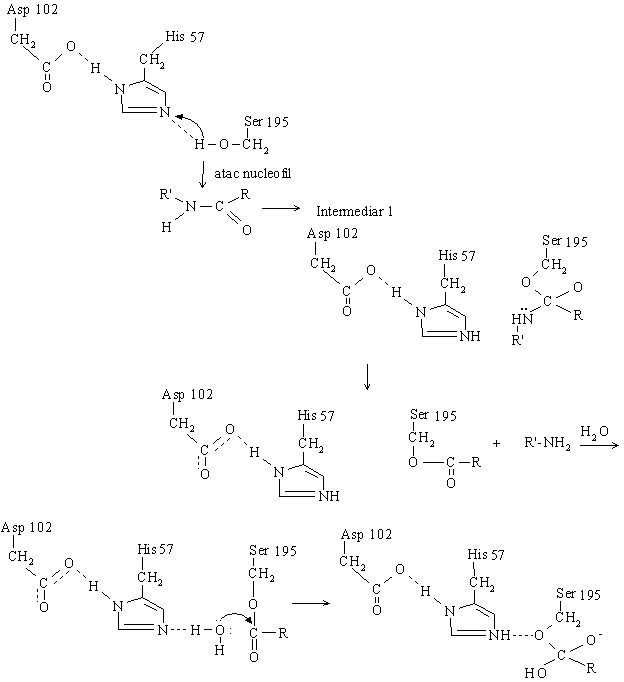
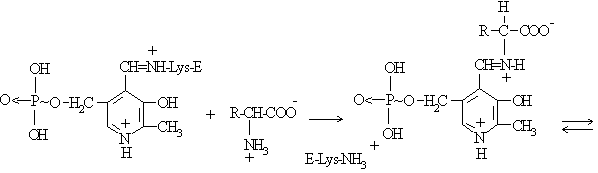
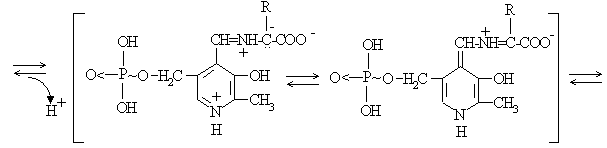


Fig. 4.14 Mecansimul de actiune a chimotripsinei - cataliza covalenta

Cele mai multe enzime care actioneaza prin cataliza covalenta prezinta cinetica mecanismului de tip ping-pong.

In cazul transaminazelor, enzima leaga prin legatura covalenta mai intai coenzima, piridoxal fosfatul, si apoi se realizeaza schimbul cu substratul (Fig.4.15)





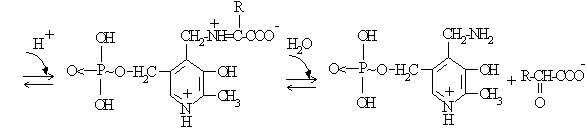


Fig.4.15 Cataliza covalenta prin mecanism de tip ping-pong - transaminaze

**Inhibitia enzimatica**

Inhibitia enzimatica a fost clasificata in moduri diferite:

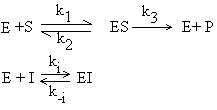
        **inhibitie reversibila**, fiind determinata de compusii care interactioneaza cu enzima prin interactii necovalente care poate fi **competitiva** si **necompetitiva;**

        **inhibitie ireversibila**, ce se manifesta prin alterarea de durata a structurii enzimei ca urmare a unor legaturi mai puternice.

Efectul net al inhibitiei ireversibile este scaderea concentratiei enzimei active. Inhibitia ireversibila este de tip **incompetitiv.**

**Inhibitia competitiva**

Inhibitorul competitiv prezinta analogie structurala cu substratul, avand astfel afinitate pentru situsul catalitic al enzimei si deci apare o competitie intre enzima si substrat pentru ocuparea situsului catalitic. Legatura prin care se leaga inhibitorul este de aceeasi natura cu cea prin care se leaga substratul. Reactiile care au loc in acest caz sunt urmatoarele:



Este o inhibitie reversibila, deoarece prin cresterea concentratiei de substrat se indeparteaza inhibitorul competitiv de la situsul catalitic, legarea inhibitorului competitiv la enzima fiind reversibila (Fig.4.16).

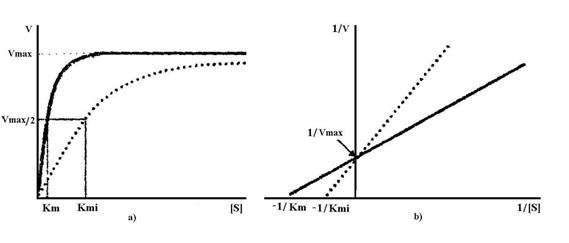


Fig.4.16 Efectul inhibitorului competitiv asupra cineticii reactiei enzimatice

a)      Reprezentarea Michaelis-Menten b) Reprezentarea Lineweaver-Burk

Exemple de inhibitie competitiva:

        succinat dehidrogenaza enzima ce transforma acidul succinic ]n acid fumaric, este inhibata competitiv de acizii dicarboxilici: acid malonic, acid malic, acid oxalic, asemanatori structural cu substratul acestei enzime;

        actiunea unor medicamente se datoreaza faptului ca sunt inhibitori competitivi (Tabel 4.5).

De exemplu, sulfanilaminda isi exercita actiunea bacteriostatica prin inhibitie competitiva. Sulfanilamida este asemanatoare structural cu acidul p-aminobenzoic, pe care il poate inlocui in timpul sintezei acidului folic de catre bacterii pentru care este factor de crestere. In lipsa acidului folic bacteriile mor. In terapia cancerului se utilizeaza analogi structurali ai bazelor purinice si pirimidinice, ce inhiba sinteza acizilor nucleici, impiedicand diviziunea celulara care este mult mai rapida la celulele tumorale.

De exemplu, metotrexatul este antagonist FH2 pentru dihidrofolat reductaza. Biosinteza prostaglandinelor este inhibata de anumiti acizi grasi, inhibitori competitivi ai acizilor cu 20 atomi de carbon folositi ca substrat.

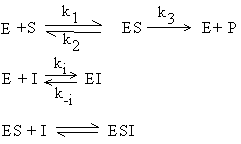
**Tabel 4.5 Medicamente - inhibitori competitivi**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Medicament inhibitor** | **Afectiune** | **Enzima tinta** |
| Captopril  Aspirina  Norfloxacin  Lovastatin  Acid clavulanic  Aciclovir  Zidovudina  Omeprazol  Alopurinol  Trimetoprim  Metotrexat  Fluorouracil  Fenelzina  Acetazolamida  Zileuton | Hipertensiune  Inflamatie, durere, febra  Infectii urinare  Hipercolesterolemie  Rezistenta bacteriana  Herpes  SIDA  Ulcer peptic  Guta  Infectii bacteriene  Cancer  Cancer  Depresii  Glaucom  Alergii | Enzima de conversie a angiotensinei  Prostagladin sintaza  ADN-giraza  HMGCoA reductaza  Β-Lactamaza  ADN polimeraza virala  Revers transcriptaza virala  Pompa de H+  Xantin oxidaza  Dihidrofolat reductaza  Dihidrofolat reductaza  Timidilat sintaza  Monoaminooxidaza cerebrala  Anhidraza carbonica  Lipoxigenaza |

**Inhibitia necompetitiva**

Inhibitorul necompetitiv nu se leaga la acelasi situs cu substratul, nu prezinta asemanare structurala cu acesta, deci efectul acestuia nu poate fi inlaturat prin cresterea concentratiei de substrat. Inhibitorul necompetitiv interactioneaza cu complexul ES sau si cu complexul ES si cu enzima.

Reactiile care au loc in acest caz sunt urmatoarele:



Inhibitia necompetitiva poate fi: **pura**, daca legarea inhibitorului la enzima nu are efect asupra legarii substratului la enzima (Fig.4.17); **mixta**, cand legarea inhibitorului la enzima afecteaza legarea substratului la enzima.

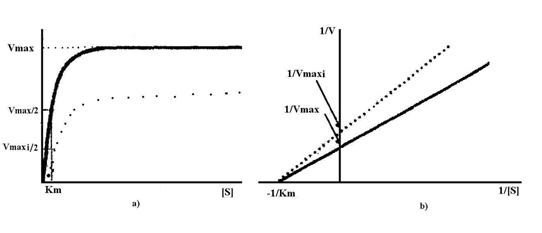


Fig.4.17 Efectul inhibitorului necompetitiv asupra cineticii reactiei enzimatice

a) Reprezentarea Michaelis-Menten b) Reprezentarea Lineweaver-Burk

**Tipuri de inhibitori necompetitivi**:

        ioni sau molecule ce actioneaza al nivelul cofactorilor: CN-,CO;

        inhibitori ai grupelor -SH libere ale enzimei: acid iod acetic, p-clormercuribenzoat;

        metale grele: argint, mercur, plumb, ce actioneaza la nivelul grupelor -SH ale enzimei;

        agenti de chelatare: EDTA.

**Enzime allosterice**

Exista enzime a caror activitate poate fi modulata de **liganzi** care actioneaza altfel decat inhibitorii competitivi sau necompetitivi. Termenul de **ligand** defineste orice molecula care se poate lega de o macromolecula. Include si molecule mici, precum ATP-ul, dar si proteine cu masa moleculara mica.

Liganzii care modifica activitatea enzimelor dar raman nemodificati ca rezultat al actiunii enzimei se numesc **efectori** sau **modulatori**. Ei pot fi **activatori** sau **inhibitori.**

Enzimele care raspund la actiunea unor modulatori se numesc **enzime allosterice** si actioneaza in etapele determinante de viteza ale cailor metabolice, intervenind in reglarea proceselor metabolice. Enzimele allosterice au, pe langa centrul activ, si situsuri allosterice.

Liganzii care se pot lega la situsul alosteric se numesc **efectori allosterici** sau **modulatori allosterici.** Legarea unui efector allosteric determina o modificare conformationala a enzimei astfel ca afinitatea sa pentru substrat sau pentru alti liganzi se modifica (Fig.4.19).

**Efectorii allosterici pozitivi** se leaga la un **situs activator** si cresc afinitatea enzimei pentru substrat, iar cei **negativi** se leaga la un **situs inhibitor** si scad afinitatea enzimei pentru substrat.

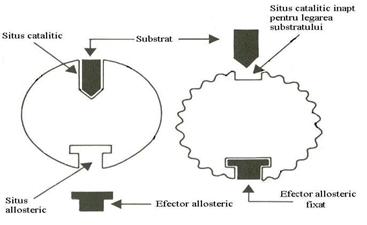


Fig.4.19 Modificarea allosterica a unei enzime

Efectorii pot afecta km sau vmax a reactiei enzimatice.

Enzimele allosterice pot fi:

        **monomerice** - sunt doar doua: ribonucleozid difosfat reductaza si piruvat UDP-N-acetil-glucozamin-transferaza.

        **oligomerice -** alcatuite din protomeri.

Legarea ligandului la un protomer poate influenta legarea aceluiasi tip de ligand la ceilalti protomeri, aceasta fiind o **interactiune homotropa** care este intotdeauna pozitiva si, de asemenea, ea poate influenta si legarea altor liganzi sau a substratului, fiind o **interactiune** **heterotropa** care poate fi pozitiva sau negativa.

**Cinetica reactiilor catalizate de enzimele alosterice**

Ca o consecinta a interactiunilor dintre situsul catalitic, situsul activator si inhibitor, la reprezentarea grafica a vitezei de reactie in functie de concentratia de substrat, se obtine o curba sigmoida (Fig.4.20).

Efectorii negativi deplaseaza curba spre concentratii mari de substrat, in timp ce, cei pozitivi deplaseaza curba spre concentratii ai mici de substrat.

Aceasta comportare este foarte importanta pentru reglarea proceselor biochimice.

De exemplu, la o concentratie data de substrat, viteza de reactie scade in prezenta unui modulator negativ.Interactiunea intre situsuri este explicata prin fenomenul de **cooperativitate**. Nu trebuie facuta confuzie intre cooperativitate si allosterism.

Efectul allosteric este reprezentat de modificarile conformationale ce apar intr-un protomer ca raspuns la legarea ligandului la un situs allosteric.

Cooperativitatea implica modificarea conformatiei unui protomer ce determina modificarea protomerului adiacent pentru a-i modifica afinitatea pentru un efector sau substrat (de exemplu, legarea oxigenului la hemoglobina).

Efectul allosteric poate aparea si independent de cooperativitate. De exemplu, la alcool dehidrogenaza, modificarile conformationale apar independent la fiecare protomer, odata cu legarea efectorilor allosterici.

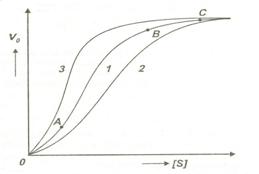


Fig.4.20 Curba de saturare cu substrat a enzimelor allosterice

**Modele de cooperativitate in modularea activitatii enzimelor allosterice**

Pentru a explica comportarea diferita fata de enzimele clasice a enzimelor allosterice, s-au propus mai multe modele intre care cele mai importante sunt:

        **modelul concertat** (Monod, Wyman, Changeux);

        **modelul secvential** (Koshland, Nemethy, Filmer).

**Modelul concertat** propune existenta a doua stari pentru enzima: **starea tensionata** T si **starea relaxata** R, care sunt in echilibru (Fig.4.21).

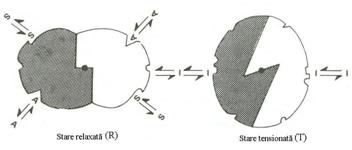


Fig.4.21 Starile T si R ale enzimelor allosterice

Activatorii si substratul favorizeaza starea relaxata si deplaseaza echilibrul spre starea R, in timp ce inhibitorii favorizeaza starea tensionata T. O modificare conformationala a unui protomer determina modificarile corespunzatoare ale tuturor celorlalti protomeri.

Acest model nu explica cooperativitatea negativa. In cazul enzimelor cu mai mult de patru monomeri, fixarea substratului determina tranzitia oligomerului.

**Modelul secvential** presupune ca legarea ligandului determina modificari conformationale intr-un protomer. Aceasta induce modificari ale protomerului adiacent aflat in continuitate cu primul. Efectul ligandului este transmis secvential oligomerului, determinand cresterea sau scaderea afinitatii pentru ligand. Apar forme hibride.

Acest model explica cooperativitatea pozitiva si negativa. Un modulator pozitiv induce o conformatie a protomerului care are ca efect cresterea afinitatii pentru substrat, iar cel negativ induce o conformatie diferita, cu afinitate redusa pentru substrat.

**Retroinhibitia**

Este un caz special al inhibitiei allosterice in care inhibitorul este chiar produsul final al caii metabolice (**inhibitie feed-back**). In cazul unei succesiuni de reactii de tipul prezentat, o acumulare excesiva de produs final in celule determina, prin mecanism allosteric, inhibitia enzimei E1 ce actioneaza in prima etapa. Procesul este oprit la restabilirea concentratiei normale de produs final.

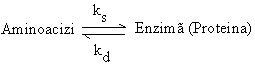
http://www.scritube.com/files/biologie/238_poze/image079.gif

Inhibitia allosterica are rol important in procesele de reglare metabolica.

**Reglarea activitatii enzimatice**

Reglarea activitatii enzimatice se poate face prin:

        *Modificarea cantitatii de enzima*. Cantitatea de enzima este determinata de echilibrul dintre **rata de sinteza** si **rata de degradare** a enzimei codificate genetic (**turnover**-ul enzimei). Cele doua procese implica factori de control diferiti. Sinteza se face in prezenta unor **inductori**, iar represia implica factori care limiteaza sinteza favorizeaza degradarea enzimei (**represor**).



Daca ks>kd enzima este inductibila, iar daca ks<kd, enzima este represibila.

        *Alterarea rezervei de reactanti*. Concentratia intracelulara medie a substratului, coenzimei, are importanta mai mica asupra activitatii enzimei. Este importanta concentratia unor metaboliti intermediari in vecinatatea centrului activ al enzimei.

        *Alterarea eficientei catalitice a enzimei*. Este mediata de actiunea unor inhibitori enzimatici.

        *Reglara allosterica*. Este determinata de actiunea enzimelor allosterice ce pot fi reglate de activatori, inhibitori prin inhibitie feed-back.

        *Modificarea covalenta* explicata de Fisher si Krebs (Premiul Nobel pentru medicina in 1992). Fosforilarea-defosforilarea unor resturi de serina, tirozina din structura enzimelor activeaza sau dezactiveaza enzimele.

Reglarea activitatii enzimelor este foarte importanta pentru celule, in cursul dezvoltarii dobandindu-se si alte optiuni de reglare cum ar fi:

        *Sinteza sub forma de zimogeni*, inactivi, care adopta conformatia specifica numai in anumite conditii de pH, activatori, procesul fiind reversibil;

        *Sinteza sub forma de izoenzime* care se sintetizeaza in structurile ce au conditiile conforme cu necesarul pentru o actiune optima. De exemplu, lactat dehidrogenaza.

        *Prezenta unor proteine modulatoare*. Este vorba despre subunitatile reglatoare ce suprima activitatea subunitatilor catalitice daca sunt atasate de acestea (vezi Fig.4.8).

**Aplicatii practice ale enzimelor**

**A.** Principiile enzimologiei sunt aplicate in laborator la **masurarea activitatii enzimatice** in **scop diagnostic** si **a concentratiei de substrat**.

Enzimele plasmatice sunt: **enzime plasmatice functionale**, active asupra unor substraturi plasmatice (de exemplu, lipoprotein lipaza) si **enzime plasmatice nefunctionale** ce ajung in plasma in cantitate foarte mica in conditii normale, activitatea lor crescand in cazul unor afectiuni ale organelor ce le contin. Dintre acestea cele mai importante sunt **enzimele celulare**. Modificarea permeabilitatii membranelor sau distrugerea celulelor sunt insotite de eliminarea enzimelor in spatiul extracelular. Enzimele citoplasmatice apar inaintea enzimelor mitocondriale. De exemplu, transaminazele, LDH, CK, aldolaza.

Pentru diagnosticarea unor afectiuni specifice unui anumit organ este ideala cunoasterea unor enzime specifice organului respectiv, numite **enzime marker**. Gasirea unor markeri exclusivi este extrem de dificila totusi se poate considera ca unele dintre enzimele a caror activitate se determina in laborator au aceasta calitate.

De exemplu, **amilaza** este marker pentru **pancreas**, **fosfataza acida** pentru **prostata**, **OCT** pentru **ficat**, **izoenzimele LDH1** si **CK-MB** sunt markeri in **afectiunile miocardului**, izoenzimele **LDH4** si **LDH5** sunt markeri pentru **ficat** si **muschi**.

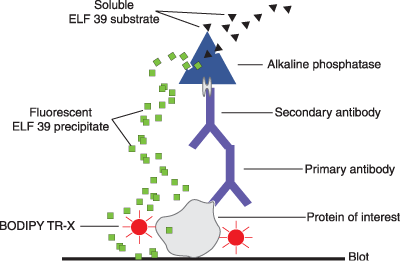
In laborator, enzimele se folosesc si ca "reactivi" pentru dozarea unor componente plasmatice prin metode enzimatice, cum ar fi glucoza, colesterolul, ureea, creatinina, etc.

**B. Enzimele imobilizate** sunt enzimele legate chimic de un suport diferit ca structura: gel de silice, alumina, carbune activ, rasini schimbatoare de ioni, polizaharide modificate (DEAE -sephadex, carboximetil celuloza). Suportul trebuie sa indeplineasca anumite caracteristici: sa permita atacul enzimei fara pierdere de activitate enzimatica, nu trebuie sa fie inactivat de sange, nu trebuie sa provoace hemoliza sau sa reactioneze cu plachetele sanguine, nu trebuie sa prezinte toxicitate sau sa genereze raspuns imun, sa elibereze produsi toxici (in cazul in care enzimele imobilizate pe acesta vin in contact cu organismul uman).

**1. Tehnicile moderne de imunologie** (EIA, ELISA) folosesc enzimele ca indicatori. Anticorpii specifici pentru un antigen sunt cuplati cu enzime indicatoare (**peroxidaza** din hrean, **fosfataza alcalina**). Acestea, dupa transformarea unui substrat specific, genereaza produsi colorati a caror concentratie este proportionala cu cea de antigen.

**2. Enzimele imobilizate** se folosesc ca reactivi in analizoarele de chimie uscata. Ele sunt imobilizate intr-un suport de dimensiuni reduse cu tamponul adecvat, cofactorii, cosubstratul si indicatorul de culoare. Plasma furnizeaza substratul si apa necesara activarii sistemului. Enzimele sunt stabile prin legarea de o matrice si pastrarea intr-un loc uscat.

**3. Enzimele imobilizate** pe o matrice insolubila se folosesc si in reactoarele chimice din industria farmaceutica, ca **reactivi specifici**



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Molecula tinta** | **Ligand** | **Proba** |
| Antigene  Anticorpi  Lectine  Glicoconjugati  Enzime  Receptori  Acizi nucleici  Virusuri, bacterii, celule, organite subcelulare | Anticorpi  Antigene  Glicoconjugati  Lectine  Substraturi, inhibitori  Hormoni, toxine  Probe ADN/ARN  Toate | **Enzime**  Markeri radioactivi  Compusi fluorescenti  Cromofori |

**C. Enzimele - agenti terapeutici**. Se utilizeaza cu prudenta, deoarece datorita naturii proteice pot fi hidrolizate de enzimele digestive sau pot provoca reactii imunologice in cazul unei prelucrari si purificari ineficiente.

*Enzimele in medicatia vasculara*. **Streptokinaza**, amestec enzimatic obtinut din streptococ, are actiune fibrinolitica (trombolitica), fiind utila pentru activarea hidrolizei trombilor formati in conditii patologice, de exemplu in infarct miocardic.

**Urokinaza** obtinuta din urina are acelasi rol.

Diferitele produse farmaceutice ce reprezinta **activatorul tisular al plasminogenului** (tPA) sunt folosite pentru dizolvarea cheagului de fibrina. **Heparinaza** microbiana imobilizata poate fi folosita pentru indepartarea heparinei folosite in tratament ca anticoagulant.

**Hemocoagulaza (reptilaza)** activeaza transformarea fibrinogenului in fibrina si este folosita pentru tratarea hemoragiilor nedeterminate de deficitul unor factori ai coagularii.

*Enzimele in terapia antitumorala.* Ex. **asparaginaza** este folosita de pacientii cu leucemie deoarece celulele tumorale au afinitate mare pentru asparagina si scazand nivelul acesteia nu mai este posibila dezvoltarea lor. Fenilalanin amonioliaza este o alta enzima ce se poate utiliza imobilizata pentru a reduce cantitatea de fenilalanina la pacientii cu cancer sau fenilcetonurie.

*Enzimele folosite in tulburarile digestive.* Enzimele digestive se folosesc ca terapie de substitutie pentru a realiza digestia proteinelor (**pepsina, chimotripsina, tripsina, carboxipeptidaza***),* glucidelor *(***amilaza***)* si lipidelor *(***lipaza**). Se utilizeaza asocieri de mai multe enzime, dar si cu substante utile digestiei (**bila, hemicelulaze**). Exista si preparate ce contin enzime proteolitice de natura vegetala (**ficina, bromelina, papaina**).

*Enzimele folosite ca antiinflamatoare si cicatrizante*. Sunt diferite endopeptidaze si enzime ce actioneaza asupra proteoglicanilor care degradeaza tesuturile alterate de la suprafata unor leziuni facilitand penetrarea medicamentelor, vindecarea ranilor, reducerea edemelor (se asociaza in medicatia dermatologica, ORL, oftalmica): **hialuronidaza, tripsina, chimotripsina, papaina, lizozim**